



②1 Aktenzeichen: 195 03 359.0-23
②2 Anmeldetag: 2. 2. 95
④3 Offenlegungstag: —
④5 Veröffentlichungstag
der Patenterteilung: 22. 2. 96

Innerhalb von 3 Monaten nach Veröffentlichung der Erteilung kann Einspruch erhoben werden

⑦3 Patentinhaber:
KWS Kleinwanzlebener Saatzucht AG, 37574
Einbeck, DE

⑦4 Vertreter:
Grünecker, Kinkeldey, Stockmair & Schwanhäusser,
Anwaltssozietät, 80538 München

⑦2 Erfinder:
Schöffl, Fritz, Prof. Dr., 72076 Tübingen, DE; Hübel,
Anja, 72076 Tübingen, DE; Jeong, Hee Lee, 72076
Tübingen, DE

⑤6 Für die Beurteilung der Patentfähigkeit
in Betracht gezogene Druckschriften:
DE 38 10 286 C2
Scharf et al., The EMBO Journal 9, S.4495-4501, 1990;
E. Vierling: The Roles of Heat Shock Proteins in
Plants, in: Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol.
Biol. 42, 579-620, 1991;

C.H. Foyer et al., Plant, Cell and Environment 17,
507-523, 1994;
Y. Yang et al., Plant Physiol. 101, 209-216, 1993;
D. Neumann et al., Planta 194, 360-367, 1994;
G. Schuster et al., The EMBO Journal 7, 1-6, 1988;
P. Mehlen et al., Eur. J. Biochem. 215, 277-284, 1993;
A. Hübel, F. Schöffl, Plant Molec. Biol. 26, 353-362,
1994;
K.D. Scharf et al. in: Plant Promoters and
Transcription Factors, S.121-158, Springer
Verlag, Berlin-Heidelberg 1994;
F. Schöffl et al., Developmental Genetics 8, 365-374,
1987;

⑤4 Streßtolerante Pflanzen und Verfahren zu deren Herstellung

⑤7 Die vorliegende Erfindung betrifft Pflanzen mit erhöhter
Streßtoleranz, die erhalten werden können durch Einbringen
einer Nukleinsäure, die für einen konstitutiv aktiven Trans-
kriptionsaktivator kodiert, in eine Pflanzenzelle und Regene-
rieren einer transgenen Pflanze. Die Pflanzen besitzen einen
erhöhten Spiegel an Schutzproteinen unter Normalbedin-
gungen in Vergleich zu den jeweiligen Wildtyppflanzen.

Beschreibung

Die vorliegende Erfindung betrifft eine Pflanze mit erhöhter Streßtoleranz mit den Merkmalen des Anspruchs 1, zu deren Herstellung mit den Merkmalen des Anspruchs 1.

In sämtlichen Organismen, so auch in Pflanzen, werden Hitzeschockproteine (HSP) in Reaktion auf stark erhöhte Temperaturen oder Hitzeschock (HS) synthetisiert. Die biologische Bedeutung dieser als HS-Antwort bekannten Reaktion ist der Schutz zellulärer Proteine und Strukturen während einer Streßphase und/oder in der darauffolgenden Erholungsphase. Die HS-Antwort kann auch durch andere abiotische Streßfaktoren (Stressoren) wie z. B. Schwermetalle, Arsenit oder Trockenheit ausgelöst werden. Es handelt sich bei der HS-Antwort um eine allgemeine Streßreaktion, die das Überleben der Zelle und damit des Organismus unter ungünstigen Umweltbedingungen sichert. Die Schutzwirkung der HSPs beruht überwiegend auf einer Minimierung der Schäden, die durch die Denaturierung von Proteinen aufgrund der Einwirkung der Stressoren auf den Organismus entstehen. Fast alle HSP sind molekulare Chaperone (vgl. Tab. 1), die eine reversible Bindung mit partiell denaturierten Proteinen eingehen und dadurch eine korrekte Renaturierung (Faltung) dieser Moleküle ermöglichen bzw. beschleunigen. HSPs sind in der Lage, den Anteil an denaturiertem Protein aufgrund der Streßeinwirkung zu senken, bzw. den Anteil korrekt gefalteter, biologisch aktiver Proteine zu erhöhen. Weitere Einzelheiten über die Rolle der Heat-Shock-Proteine in Pflanzen sind beschrieben bei Vierling, E. in *Annu. Rev. Plant Physiology Plant Mol. Biol.* 1991, Band 42, Seiten 579–620.

Obwohl, wie oben ausgeführt, sämtliche Organismen bei Streß eine HS-Antwort zeigen, kommt dieser Antwort bei Pflanzen eine besondere Bedeutung zu. Pflanzen können aufgrund ihrer Gebundenheit an den Standort am wenigsten einen Umweltstreß vermeiden oder diesem Ausweichen und sind am extremsten den abiotischen Stressoren ausgesetzt. Dabei haben die kleinen HSPs (HSP20-Gruppe mit einem Molekulargewicht von ungefähr 17–20 kDa) eine besonders wichtige Bedeutung für die Antwort der Pflanzen auf Streß. Diese Proteine werden stark exprimiert, und es gibt mehrere verwandte Gene (ein Genfamilie). Im Gegensatz zu anderen HSP-Gruppen (z. B. HSP70), gibt es keine HSP20 oder HSP20-ähnliche Proteine, die auch bereits bei Normalbedingungen, z. B. bei der normalen Umgebungstemperatur, gebildet werden. Ohne Umweltstreß werden HSP nur in bestimmten Stadien der Pflanzenentwicklung synthetisiert, wobei dies speziell in den Spätphasen der Pollenentwicklung und der Embryogenese (Dessikationsphase der Samenreife) beobachtet wird.

Es sind jedoch keine Pflanzen bekannt, bei denen unter normalen streßfreien Bedingungen merkliche Spiegel an HSPs vorliegen. Insbesondere sind keine Pflanzen bekannt, bei denen unter streßfreien Bedingungen eine ganze Gruppe an HSPs oder gar sämtliche HSPs in biologisch relevanten Konzentrationen in der Pflanze vorliegen.

Der vorliegenden Erfindung lag das technische Problem zugrunde, Pflanzen bereitzustellen, die eine erhöhte Streßtoleranz aufweisen, und die insbesondere auf eine Vielzahl verschiedener Stressoren mit erhöhter Toleranz reagieren können.

Dieses Problem wird gelöst durch eine Pflanze mit erhöhter Streßtoleranz, enthaltend mindestens einen konstitutiv exprimierten und aktiven Transkriptionsaktivator für die konstitutive Expression von mindestens einem Schutzprotein, das üblicherweise nur durch Streßfaktoren induziert wird.

Ein weiteres technisches Problem bestand darin, ein Verfahren zur Herstellung einer Pflanze mit erhöhter Streßtoleranz bereitzustellen.

Dieses technische Problem wird erfindungsgemäß gelöst durch ein Verfahren, umfassend die Schritte:

- (a) Einbringen einer Nukleinsäure, die für einen konstitutiv aktiven Transkriptionsaktivator kodiert, in eine Pflanzenzelle, und
- (b) Regenerieren einer transgenen Pflanze aus der in Schritt (a) erzeugten Pflanzenzelle.

Ein weiteres technisches Problem bestand in der Bereitstellung von Mitteln zur Erzeugung einer Pflanze mit erhöhter Streßtoleranz.

Dieses technische Problem wird gelöst durch eine Nukleinsäure, die für einen in der Pflanze konstitutiv aktiven Transkriptionsaktivator kodiert.

Fig. 1: Alternative Modelle der Regulation der HS-Antwort in höheren Eukaryonten.

Fig. 2 Expression des HSF-GUS-Fusionsgens in transgener Arabidopsis.

A) zeigt schematisch die Komponenten des Genfusionskonstrukts.

B) zeigt die konstitutiven GUS-Aktivitäten in transgenen Arabidopsis-Pflanzen. Die GUS-Aktivitäten wurden ermittelt für jedes Konstrukt in Proteinextrakten aus 30 einzelnen Transformanten (F0) und deren F1-Nachkommen. Die GUS-Aktivität wurde gemessen in pMol NAD/mg Protein/Minute.

C) zeigt konstitutive HSF und HSF-GUS (GH, HG) mRNAs durch Northern-Blot-Hybridisierung

Fig. 3 Konstitutive Expression von HSP18 in transgener Arabidopsis, die HSF-Fusionsproteine überexprimiert.

A) zeigt den Nachweis von HSP18 in Western-Blots.

B) zeigt den Nachweis von HSP18-mRNA durch Northern-Blot-Hybridisierung.

WT = nicht transformierte Arabidopsis; HG1, HG2, GH1, GH2 = einzelne Transformanten, enthaltend HSF-GUS bzw. GUS-HSF.

"Erhöhte Streßtoleranz" wie hierin verwendet, bedeutete die Fähigkeit einer erfindungsgemäßen Pflanze,

unter dem Einfluß von Streßfaktoren eine geringere Beeinträchtigung ihrer Leistungsfähigkeit zu zeigen als die Wildtyppflanze oder gar die volle Erhaltung ihrer Leistungsfähigkeit beizubehalten. Die erhöhte Streßtoleranz beruht vermutlich, ohne an eine Theorie gebunden zu sein, auf dem Vorhandensein von einem oder mehreren Schutzproteinen unter Normalbedingungen in einer erhöhten Konzentration im Vergleich zu der jeweiligen Wildtyppflanze. Die Leistungsfähigkeit einer Pflanze zeigt sich beispielsweise in der Wachstumsgeschwindigkeit, der Stabilität der Merkmalsausprägung, der Widerstandsfähigkeit gegenüber Pathogenen, der Qualität und des Ertrags der Ernteprodukte, der Nährstoffeffizienz, der Effizienz des Wasserhaushalts und dem Verhalten gegenüber Pflanzenschutzmitteln. 5

"Transkriptionsaktivator", wie hierin verwendet, bedeutet ein regulatorisches Protein, das im aktiven Zustand die Transkription von bestimmten Genen stimuliert. Dazu muß der Transkriptionsaktivator an bestimmte Sequenzen (sogenannte Responsive Elements) in den Promotoren der seiner Kontrolle unterstehenden Gene und/oder deren flankierende Regionen (i) erkennen, (ii) daran binden und (iii) die Transkription der Gene initiieren oder fördern. 10

Ein Transkriptionsaktivator kann als Protein entweder im aktiven (dereprimierten) oder im inaktiven (reprimierten) Zustand vorliegen. Nur im aktiven Zustand stimuliert der Aktivator die Transkription und damit die Expression der regulierten Gene. 15

Beispiele für Transkriptionsaktivatoren in Pflanzen sind beschrieben in K. D. Scharf, S. Rose, W. Zott, F. Schöffl und L. Nover in: *The EMBO Journal*, Band 9, S. 4495—4501 (1990).

"Konstitutiv exprimiert und aktiv" heißt im Zusammenhang mit dem Transkriptionsaktivator, daß der Aktivator ständig, d. h. unter Normalbedingungen wie unter Streßbedingungen, exprimiert wird und ständig in einer Form vorliegt, die seine Bindung an die Kontrollelemente der DNA erlaubt. 20

"Hitzeschockfaktor (HSF)" ist gleichzusetzen mit dem Begriff "Hitzeschock-Transkriptionsaktivator", der im aktiven Zustand über seine DNA-Bindungsdomäne an die Hitzeschockelemente (HSE) in Promotorsequenzen bindet und dadurch die Transkription der entsprechenden Gene beeinflusst. Die Aktivierung des Transkriptionsaktivators zu seiner DNA-bindenden Form erfolgt beispielsweise durch Multimerisierung, wie Trimerisierung, einzelner Aktivatorproteine. 25

Ein natürlich vorkommender HSF in Wildtyppflanzen benötigt für seine Aktivierung ein durch Umweltstreß, z. B. Hitzestreß, erzeugtes Signal.

Gene, die von HSF reguliert werden, sind z. B. die Gene für Schutzproteine, wie die Hitzeschockproteine.

"Schutzproteine", wie hierin verwendet, sind Genprodukte von Genen, deren Expression von HSF reguliert wird. Zu den bekanntesten Schutzproteinen zählen die Hitzeschockproteine, die als molekulare Chaperone in den Zellen fungieren und dadurch andere Proteine bzw. biochemische und physiologische Prozesse in der Zelle bei Streßeinwirkung schützen. Schutzproteine können enzymatische Aktivitäten besitzen, die biochemische Reaktionen katalysieren und so den Schutz von Zellen und Organismen vor streßbedingten Schädigungen (z. B. durch oxidativen Streß, zur Übersicht siehe [C.H. Foyer, P. Descourvieres und K.J. Kunert in: *Plant, Cell and Environment*, Band 17, S. 507—523 (1994)], Anaerobiose [Y. Yang, H.-B. Kwon, H.-P. Peng, M.-C. Shin in: *Plant Physiology*, Band 101, S. 209—216 (1993)] betreffend Schwermetalltoxizität [D. Neumann, O. Lichtenberger, D. Günther, K. Tschiersch und L. Nover in: *Planta*, Band 194, S. 360—367 (1994)] Photoinhibition [G. Schuster, D. Even, K. Kloppstech und J. Ohad in: *The EMBO Journal*, Band 7, S. 1—6 (1988)] und oxidativem Streß [P. Mehlen, J. Briolag, L. Smith, C. Diaz-Latoud, M. Fabre, D. Pauli, A.-P. Arrigo in: *Eur. J. Biochemistry*, Band 215, S. 277—284 (1993)]) bewirken. Hierzu zählen u. a. auch die Proteine der HSP20-Familie. 30 35 40

"Streßfaktoren (Stressoren)" sind biotische oder abiotische Faktoren, die zu einer Minderung der Leistungsfähigkeit einer Pflanze führen können.

Solche Faktoren können sein: Pathogenbefall (Viren, Viroide, Pilze, Bakterien, Insekten, Nematoden), Verwundung, Hitze (insbesondere bei der Blütenausbildung und während der Samenreife), Kälte (insbesondere während der Keimung), UV-Strahlung, hohe Lichtintensität, hohe Konzentration an Schwermetall, an Salz und/oder an Ozon, Azidität, Trockenheit und O₂-Mangel. 45

"Wildtyppflanze" hierin bedeutet eine Pflanze, die eine normale Streßtoleranz zeigt und die die Ausgangspflanze bzw. -pflanzenzelle für das erfindungsgemäße Verfahren liefert.

"Fusionsprotein", wie hierin verwendet, bedeutet ein Fusionsprotein aus einem Transkriptionsaktivator und mindestens einem weiteren Proteinbestandteil, der üblicherweise nicht in dem entsprechenden Transkriptionsaktivator vorkommt. Das Fusionsprotein besitzt die DNA-bindende Eigenschaft des Transkriptionsaktivators und ggf. weitere Eigenschaften aufgrund des weiteren Proteinbestands. Der Aktivatorbestandteil des Fusionsproteins besitzt die Fähigkeit zur DNA-Bindung und zur Regulierung der Transkription der unter seiner Kontrolle stehenden Gene, und er kann den Fremdproteinanteil an seinem N-Terminus, C-Terminus und/oder innerhalb der Proteinkette tragen. Dabei umfaßt der Fremdproteinanteil vorzugsweise ca. 500—600 Aminosäuren. 50 55

"Erhöhter Spiegel an Schutzprotein" bedeutet, daß die erfindungsgemäße Pflanze mit erhöhter Streßtoleranz ein oder mehrere Schutzproteine in einer Konzentration enthält, die höher ist als bei dem vergleichbaren Wildtyp mit normaler Streßtoleranz. Ein erhöhter Spiegel liegt beispielsweise bereits dann vor, wenn die Pflanze mit erhöhter Streßtoleranz unter streßfreien Bedingungen eine Konzentration an Schutzproteinen erreicht, die 5%, vorzugsweise ca. 15—20% oder mehr der Konzentration an Schutzproteinen unter Streßbedingungen entspricht. 60

"Normalbedingungen", wie hierin verwendet, bedeutet, daß keine "Streßfaktoren", wie oben erläutert, auf die Pflanze einwirken. Ein Übergang von Normalbedingungen auf Streßbedingungen wird beispielsweise bewirkt durch eine Temperaturerhöhung von ca. 20—25°C (Normal) auf ca. 37°C (Streß). Streßreaktionen können aber auch schon bei niedrigeren und/oder höheren Temperaturen als 37°C ausgelöst werden. 65

Eine wichtige Schaltstelle für die Regulation der HS-Antwort, d. h. der HSP-Synthese, ist die Transkription der

HSPs. Die koordinierte Expression der HSPs wird durch den zentralen Regulator, d. h. den HS-Transkriptionsfaktor (HSF) bewirkt. Der HSF nimmt somit eine Schlüsselfunktion bei der Initiation der HS-Antwort ein. Diese Funktion besteht darin, Hitzeschockpromotoren zu erkennen, daran zu binden und die Transkription der HS-Gene (die für HSP kodieren) zu stimulieren. Dieses Regulationsprinzip ist bei allen höheren Eukaryonten, einschließlich der Pflanzen, konserviert (Vgl. Fig. 1). Das zentrale Regulatorprotein HSF wird konstitutiv (d. h. permanent) gebildet, aber es ist bei normalen bzw. optimalen Wachstumsbedingungen inaktiv hinsichtlich seiner Fähigkeit an DNA zu binden und die Transkription der HS-Gene zu aktivieren. Streßwirkung auf die Pflanze hat zur Folge, daß der HSF aktiviert wird, d. h. er gewinnt seine Fähigkeit zur DNA-Bindung und Transkriptionsaktivierung der HS-Gene, und dies wiederum führt zur vermehrten Herstellung von HSPs. Die Aktivierung von HSF korreliert häufig mit einer Trimerisierung bzw. Multimerisierung von HSF-Monomeren. Die HSF-Trimerie binden an konservierte HS-Promotorelemente (als HSE bezeichnet, die das Konsensusmotiv [nGAAnnTTCn]_n enthalten). Die so erzeugten Transkripte der HS-Gene werden dann während eines Hitzeschocks bevorzugt translatiert und in relativ großen Mengen angereichert mit der Folge, daß unter Streß ein hoher Spiegel an HSPs und an anderen Schutzproteinen in der Pflanze vorliegt.

Eine Möglichkeit, die HS-Antwort zu beeinflussen, schien durch die ektopische Überexpression von HSF gegeben zu sein. Dabei sollte ein HSF-Gen unter der Kontrolle eines starken konstitutiven Promotors zu einer Überexpression des HSF und folglich zu einer vermehrten Transkription der HS-Gene mit der Folge eines erhöhten HSP-Spiegels führen. Wie von den Erfindern überraschenderweise gefunden, führte dieser Ansatz jedoch nicht zu einer Überexpression der HSPs.

Dagegen wurde jedoch im Rahmen der vorliegenden Erfindung gefunden, daß ein erhöhter Spiegel an Schutzproteinen in einer Pflanze unter Normalbedingungen erhalten wird, wenn die Pflanze einen Transkriptionsaktivator, vorzugsweise einen HSF, enthält, der konstitutiv exprimiert wird und konstitutiv im aktiven Zustand vorliegt, so daß diese Pflanze mindestens ein Schutzprotein konstitutiv exprimiert. Vorzugsweise werden in einer solchen Pflanze jedoch mehrere Schutzproteine, wie beispielsweise die Mitglieder der HSP20-Familie, sowie HSP70 und Superoxiddismutase, gleichzeitig unter dem Einfluß des Transkriptionsaktivators konstitutiv exprimiert. Die konstitutive Expression der Schutzproteine kann sogar sämtliche Schutzproteine der Pflanze betreffen.

Die erhöhte Streßtoleranz einer derart manipulierten Pflanze beruht, ohne jedoch an eine Theorie gebunden zu sein, vermutlich auf einer erhöhten Konzentration an einem bzw. mehreren Schutzproteinen bereits unter Normalbedingungen, so daß bei Auftreten eines Streßfaktors bereits Schutzproteine in größerer Menge vorliegen, um sofort die Schäden zu minimieren, die z. B. durch Denaturierung von Proteinen aufgrund der Streßsituation entstehen. Eine solche Pflanze mit erhöhter Streßtoleranz besitzt bereits unter Normalbedingungen, d. h. streßfreien Bedingungen, einen Spiegel an mindestens einem Schutzprotein, der ungefähr 5% des Spiegels an Schutzprotein ausmacht, der bei einer voll unter Streß stehenden Pflanze aufgebaut wird. Vorzugsweise enthält die erfindungsgemäße Pflanze bereits unter Normalbedingungen ca. 15–20% oder mehr des Streßproteinspiegels einer Pflanze unter Streßbedingungen, wobei ganz besonders bevorzugt die Mitglieder der HSP20-Familie unter Normalbedingungen bereits 20% des maximalen Spiegels unter Streßbedingungen erreichen.

Als Aktivator der Schutzproteine kommt vorzugsweise ein sogenannter Hitzeschockfaktor in Betracht. Diese Transkriptionsaktivatoren (Transkriptionsfaktoren) binden i.d.R. an konservierte Elemente innerhalb der HS-Promotoren, die häufig das Konsensusmotiv [nGAAnnTTCn]_n haben. Ein Beispiel für einen solchen Hitzeschockfaktor aus Pflanzen stellt der Arabidopsis-Hitzeschockfaktor dar (Vgl. Hübel, A. und Schöffl, F. in *Plant Molecular Biology*, Band 26, Seite 353–362 (1994)). Weitere Hitzeschockfaktoren sind dem Fachmann aus dem Stand der Technik wohl bekannt, wie beispielsweise beschrieben in K.D. Scharf, T. Materna, E. Treuter und L. Nover in: L. Nover (ed.) *Plant Promoters and Transcription Factors*, S. 121–158, Springer Verlag, Berlin-Heidelberg (1994).

Wie oben ausgeführt, liegt der Transkriptionsaktivator in Wildtyppflanzen unter Normalbedingungen entweder überhaupt nicht vor, oder aber in einer Form, die die DNA-Bindung, insbesondere die Bindung an HSE, nicht erlaubt. Im Rahmen der vorliegenden Erfindung konnte gezeigt werden, daß ein solcher inaktiver Transkriptionsaktivator in einen konstitutiv aktiven Transkriptionsaktivator durch Manipulation seiner nativen, inaktiven Struktur umgewandelt werden kann, vorzugsweise durch Änderung der Proteinsequenz. Die Techniken zum Ändern einer vorgegebenen Proteinsequenz sind dem Fachmann aus dem Stand der Technik wohl bekannt, wie beispielsweise beschrieben in Sambrook, J. et al., *Molecular Cloning*, Cold Spring Harbor Laboratory Press (1989). Die Modifikation des inaktiven Transkriptionsaktivators erfolgt mit dem Ziel, dem Aktivator eine konstitutive DNA-Bindungsfähigkeit zu verleihen.

Eine bevorzugte Modifikation eines HSF zu dessen Aktivierung ist die Fusion mit einem weiteren Protein (Fremdprotein), wobei das Fremdprotein vorzugsweise an den N-Terminus oder C-Terminus des HSF fusioniert wird. Geeignete Fusionspartner für einen HSF sind beispielsweise β -Glucuronidase, sowie weitere, sogenannte Reporterproteine, beispielsweise Luziferase, Struktur- oder Enzymproteine, sowie Proteine, die gleichzeitig zur Selektion von Zellen, Geweben und Pflanzen mit einem modifizierten HSF geeignet sind. Insbesondere eignen sich hierfür Neomycinphosphotransferase II, Phosphinothricinacetyltransferase und Hygromycinphosphotransferase. Weiterhin kann der HSF auch durch das Anhängen beliebiger anderer, auch synthetischer Proteine modifiziert werden.

Ob eine durchgeführte Modifikation des inaktiven HSF diesen in einen konstitutiv aktiven HSF umgewandelt hat, kann einfach dadurch festgestellt werden, daß der modifizierte HSF dahingehend untersucht wird, ob er die Fähigkeit zur DNA-Bindung unter Normalbedingungen durch die Modifikation erlangt hat. Diese Fähigkeit zur DNA-Bindung läßt sich mit aus dem Stand der Technik bekannten herkömmlichen Verfahren ermitteln, wie beispielsweise mit den dem Fachmann geläufigen Gelretardationsassays, wie beschrieben in D.D. Mosser, N.G. Theodorakis und R.J. Morimoto in: *Molecular & Cellular Biology*, Band 8, S. 4736–4744 (1988).

Als Pflanze mit erhöhter Streßtoleranz sind bevorzugt Pflanzen aus der Familie der Brassicaceae, der Klasse der Magnoliatae und der Klasse der Liliatae, wobei besonders bevorzugt sind Mitglieder der Gattungen *Brassica*, *Beta*, *Solanum*, *Lycopersicum*, *Helianthus*, *Glycine*, *Zea*, *Hordeum*, *Triticum*, *Secale* und *Oryza*.

Die erhöhte Streßtoleranz der erfindungsgemäßen Pflanzen zeigt sich in deren Fähigkeit, bei dem Einwirken von Streßfaktoren ihre Leistungsfähigkeit voll aufrecht zu erhalten, zumindest jedoch zeigen sie unter gegebenen Streßbedingungen eine geringere Beeinträchtigung ihrer vollen Leistungsfähigkeit als die Wildtyppflanze, aus der die erfindungsgemäße Pflanze hervorgegangen ist. 5

Die Leistungsfähigkeit einer Pflanze zeigt sich beispielsweise in deren Wachstumsgeschwindigkeit, der Stabilität der Merkmalsausprägung, Samen und Fruchtsubstanz, der Widerstandsfähigkeit gegenüber Pathogenen, der Qualität und des Ertrags der Ernteprodukte, der Nährstoffeffizienz, der Effizienz des Wasserhaushalts und der Verträglichkeit gegenüber Pflanzenschutzmitteln. 10

Vorzugsweise zeigen die erfindungsgemäßen Pflanzen eine verbesserte Streßtoleranz gegenüber mindestens einem der biotischen Streßfaktoren, wie Pathogenbefall (beispielsweise Viren, Viroide, Pilze, Bakterien, Insekten, Nematoden), und/oder abiotischen Streßfaktoren, Verwundung, Hitze (insbesondere bei der Blütenausbildung und während der Frucht- und Samenreife), Kälte (insbesondere während der Keimung), UV-Strahlung, hohe Lichtintensitäten, hohe Konzentrationen von Schwermetallen, von Salz und von Ozon, Azidität, Trockenheit, sowie O₂-Mangel. Besonders bevorzugt sind Pflanzen, die eine erhöhte Toleranz gegen mehrere der genannten Streßfaktoren aufweisen, ganz besonders bevorzugt sind sie toleranter gegenüber sämtlichen Streßfaktoren. 15

Bevorzugte erfindungsgemäße Pflanzen weisen bereits unter streßfreien Bedingungen, d. h. unter Bedingungen, unter denen die Pflanzen nicht einem der o.g. Streßfaktoren ausgesetzt sind (Normalbedingungen), einen erhöhten Spiegel mindestens eines Schutzproteins, vorzugsweise jedoch mehrerer Schutzproteine auf. Das Vorliegen eines erhöhten Spiegels an Schutzprotein läßt sich einfach dadurch feststellen, das der Gehalt an Schutzproteinen bei einer erfindungsgemäßen Pflanze ermittelt wird und dieser Gehalt verglichen wird mit dem Schutzproteingehalt der Wildtyppflanze. Die Schutzproteine lassen sich mit aus dem Stand der Technik bekannten herkömmlichen Verfahren aus den Pflanzen isolieren und quantifizieren. 20 25

Als Vehikel zum Einbringen eines konstitutiven aktiven Transkriptionsaktivators in die Pflanze wird eine Nukleinsäure verwendet, die für den gewünschten Transkriptionsaktivator kodiert.

Die Nukleinsäure stellt eine DNA dar, beispielsweise in Form eines Plasmids, die nach bekannten Verfahren in Pflanzen eingebracht werden kann. Beispielsweise kommt als hierfür geeignetes Plasmid das Ti-Plasmid aus dem *Agrobacterium tumefaciens* in Betracht, oder es wird eine der bekannten Techniken zum direkten DNA-Transfer verwendet. 30

Die in die Pflanze eingebrachte Nukleinsäure kodiert vorzugsweise für einen konstitutiv aktiven HSF, wobei als aktive Form besonders bevorzugt ist ein Fusionsprotein aus einem HSF und einem weiteren Protein bzw. Proteinfragment. 35

Vorzugsweise enthält die eingebrachte Nukleinsäure selbst die für die Expression des gewünschten Transkriptionsaktivators erforderlichen regulatorischen Elemente, wobei die für die Expression in Pflanzen erforderlichen Elemente in dem Stand der Technik bekannt und beschrieben sind. Alternativ kann die eingebrachte Nukleinsäure auch unter die Kontrolle von bereits in der Pflanzenzelle vorhandenen regulatorischen Elementen gebracht werden. F. Schöffl, M. Rieping und G. Baumann in: *Developmental Genetics*, Band 8, S. 365–374 (1987) beschreibt die konstitutive Expression von einem HS-Gen unter der Kontrolle des CaMV-35S-Promotors in Tabak. 40

Die Verfahren zum Einbringen einer Nukleinsäure in eine Pflanzenzelle sind dem Fachmann wohl bekannt. Auch die Regeneration einer vollständigen Pflanze aus einer Pflanzenzelle, transformiert mit einer Nukleinsäure, ist dem Fachmann geläufig und kann mit herkömmlichen Verfahren aus dem Stand der Technik erfolgen. 45

Die erfindungsgemäßen Pflanzen werden hergestellt durch Einbringen einer Nukleinsäure, die für einen konstitutiv aktiven Transkriptionsaktivator kodiert, in eine Pflanzenzelle, und Regenerieren der transgenen Pflanze aus der mit der Nukleinsäure transformierten Pflanzenzelle.

Sämtliche Maßnahmen zum Herstellen einer transgenen Pflanze sind aus dem Stand der Technik bekannt. Üblicherweise wird nach dem Einbringen einer Nukleinsäure in Pflanzenzellen nach denjenigen Pflanzenzellen selektiert, die die Nukleinsäure aufgenommen haben und diese stabil exprimieren. Aus diesen Transformanten wird dann mit herkömmlichen Verfahren eine vollständige Pflanze regeneriert. Besonders vorteilhaft ist es, wenn der zur Selektion der geeignet transformierten Pflanzen erforderliche Selektionsmarker durch das Fremdprotein bereitgestellt wird, das als Fusionspartner des HSF dient. 50

Die erfindungsgemäßen Pflanzen sind von großem Nutzen auf dem Gebiet der Landwirtschaft, insbesondere wo unter schwierigen Wachstumsbedingungen, d. h. unter dem Einfluß von Streßfaktoren Pflanzen angebaut werden müssen. 55

Die folgenden Beispiele erläutern die Erfindung. Dabei wurden die meisten Versuche mit *Arabidopsis thaliana* durchgeführt, die bekanntermaßen ein beliebtes Modellsystem für Kulturpflanzen darstellt. Dieses Modell verkörpert alle wichtigen genetischen, physiologischen, biochemischen und molekularen Eigenschaften höherer Pflanzen. Insbesondere stellt diese Pflanze ein Modellsystem für die Regulation der HS-Antwort bei Kulturpflanzen dar. 60

Der Hitzeschockfaktor aus *Arabidopsis*, ATHSF1

Der Hitzeschockfaktor wird konstitutiv exprimiert, aber seine Aktivierung zur DNA-Bindung ist strikt an die Induktion durch Wärme gebunden (bei 37° C), und die Aktivierung erfordert den Übergang von Monomeren zu Trimeren. ATHSF1 ist ausführlich beschrieben in Hübel, A. und Schöffl, F. in *Plant Molecular Biology*, Band 26, 65

Herstellen von konstitutiv aktivem ATHSP1

Es wurden zwei Arten an Genfusionsprodukten, HSF-GUS (HG) und GUS-HSF (GH), hergestellt, wie in Fig. 2A gezeigt. Die Fusionen wurden konstitutiv exprimiert mit Hilfe des CaMV 35S-Promotors in transgenen Arabidopsis-Pflanzen. Es spielt für die Aktivität des Fusionsprodukts keine Rolle, ob ATHSF1 mit dem Fremdprotein am N- oder am C-Terminus fusioniert wurde. Das zur Transformation verwendete Konstrukt wurde hergestellt, indem ATHSF1-cDNA subkloniert wurde in dem Pflanzenvektor BIN19, der das Glucoronidase (GUS)-Reportergen unter der Kontrolle des konstitutiven CAMV35S-Promotors, sowie die Terminationssequenz der Nopalinsynthese (NOS-ter) enthält. Konstruktionstechnisch bedingt fehlte dem ATHSF1-Anteil in der HSF-GUS-Fusion 15 Aminosäuren an dem C-Terminus und in der GUS-HSF-Fusion 5 Aminosäuren an dem N-Terminus. In der GUS-HSF-Fusion ist der GUS-Anteil um 5 Aminosäuren am C-Terminus verkürzt.

Expression der Fusionen in Arabidopsis

Die GUS-Aktivitäten wurden für jedes Konstrukt ermittelt in Proteinextrakten aus 30 verschiedenen Transformanten (F0) und der F1-Folgegeneration. Die GUS-Aktivität wurde gemessen in pMol NAD/mg Protein/Minute.

Arabidopsis thaliana (Ökotyp Columbia) wurde mit Agrobacterium tumefaciens, enthaltend die von BIN19 stammenden Vektorplasmide, mit Hilfe des von Valvekens, M. van Montagu und M. van Lijsebettens in: Proceedings of the National Academy of Science, USA, Band 85, S. 5536—5540 (1988) beschriebenen Verfahrens transformiert. F1-Samen wurden erzeugt aus geselbsteten Transformanten, und die GUS-Aktivitäten wurden in den Proteinextrakten aus Blattgewebe bestimmt unter Verwendung des Fluoreszenzverfahrens, wie beschrieben von R.A. Jefferson, T.A. Kavanagh und M.W. Bevan in: The EMBO Journal, Band 6, S. 3901—3907 (1987). Die gefundenen GUS-Aktivitäten sind in Fig. 1B gezeigt.

Ferner wurden die mRNA-Spiegel von HSF und der HSF-Fusionen im Wildtyp wie auch im transgenen Arabidopsis ermittelt. Hierzu wurde die Gesamt-RNA isoliert aus dem Blattgewebe von einzelnen Transformanten und von Wildtyppflanzen folgend auf oder ohne Wärmestreß (HS) bei 37°C für 3 Stunden. Die RNAs wurden analysiert durch Northern-Blot-Hybridisierung mit Hilfe von 30 µg Gesamt-RNA/Spur und einer ³²P-markierten ATHSF1-cDNA-Sonde, wie beschrieben von Severin und Schöffl in K. Severin und F. Schöffl in: Plant Molecular Biology, Band 15, S. 827—833 (1990). Die mRNA-Spiegel der chimären Gene waren signifikant erhöht im Vergleich zu den Spiegeln des authentischen ATHSF1-Transkripts, wie aus Fig. 1C ersichtlich. Diese Daten zeigen, daß die chimären HSFs stabil in den transgenen Pflanzen zusätzlich zu dem endogenen Wildtyp-ATHSF1 exprimiert werden.

Konstitutive HSP-Synthese

Für die kleinen HSP bei Arabidopsis sind bisher 5 Gene bekannt, 3 für Klasse I (zu der auch das unten getestete HSP18 gehört), 2 für Klasse II (Vgl. Vierling, E. s. o.). mRNAs innerhalb einer Familie sind so stark konserviert, daß sie bei Hybridisierungen kreuzreagieren.

Die konstitutive Expression von HSP18 in transgenen Arabidopsis, die HSF-Fusionsproteine überexprimieren, ist in Fig. 3 gezeigt.

Zur Western-Blot-Analyse wurden die Proteine isoliert ohne oder folgend auf einen HS (vgl. auch Fig. 1) durch rasches Homogenisieren von Blattgewebe in Puffern, enthaltend 8 M Harnstoff. Analysenproben (30 µg/Spur) wurden einer SDS-PAGE unterzogen und mit Hilfe des Elektrophoretischen Verfahrens auf Nitrozellulose übertragen. HSP18 wurde nachgewiesen durch einen Antikörper, der gegen ein rekombinantes Arabidopsis HSP17.6 gerichtet war. Die Gensequenz für HSP17.6 ist beschrieben in K.W. Helm und E. Vierling in: Nucleic Acids Research, Band 17, S. 7995 (1989). Die Banden wurden sichtbar gemacht durch Inkubation mit Mäuse-Anti-Huhn-IgG, an das alkalische Phosphatase gekoppelt war, und Anfärben mit dem Nitrotetrazoliumblau/5-Brom-4-chlor-3-indolyl-phosphatssystem, wie beschrieben in E. Engvall und P.J. Perlmann in: Journal of Immunology, Band 109, S. 129 (1972).

Die Northern-Blot-Hybridisierungen wurden durchgeführt wie beschrieben in K. Severin und F. Schöffl in: Plant Molecular Biology, Band 15, S. 827—833 (1990).

Das Ergebnis der HSP-Expressionsstudien zeigt, daß im Wildtyp (WT) bei Raumtemperatur (RT) keine HSP18mRNA nachweisbar ist. Mittels Antisera, die gegen rekombinantes HSP18 aus Arabidopsis gerichtet sind, können in den transgenen Pflanzen konstitutiv exprimierte kleine HSPs nachgewiesen werden. Die Antisera, obwohl sie gegen ein individuelles HSP gerichtet sind, erkennen wegen der starken Konservierung der HSP-Struktur alle Mitglieder einer HSP-Familie. Im Western-Blot ist ein deutlicher Unterschied zwischen WT (keine Expression) und transgenen Pflanzen bei RT zu erkennen. Der in den transgenen Pflanzen bei Raumtemperatur aufgefundene Spiegel an konstitutiv exprimierten HSP beträgt ca. 15—20% der durch HS induzierten Menge an HSPs (ermittelt mit Hilfe der Immundiffusion). Dies entspricht etwa 1—2 ng HSP18/µg Gesamtprotein. Nach einem Hitzeschock steigt in den transgenen Pflanzen die Menge der kleinen HSP auf den Wert, der auch beim hitzeinduzierten Wildtyp erreicht wird (Vgl. Fig. 3).

Die mRNA-Spiegel für HSP70, das konservierteste aller Schutzproteine, sind in HSF-GUS (GUS-HSF) transgenen Pflanzen ebenfalls stark konstitutiv erhöht im Vergleich zum nicht induzierten Wildtyp. Dies zeigt, daß die konstitutive Streßreaktion nicht nur auf die kleinen HSP beschränkt ist, sondern auch HSP70 und weitere HSP umfaßt. Dies heißt mit anderen Worten, daß der konstitutiv aktive HSF eine Palette von HSPs

induziert.

Konstitutive Aktivität der HSF-Fusionsproteine und HSF-Interaktionen

Die Derepression der HSF-Aktivität der in Arabidopsis exprimierten Fusionsproteine (HSF-GUS und GUS-HSF) konnte durch dreierlei Experimente bewiesen werden: 5

1. Es erfolgt eine konstitutive Trimerisierung der HSF-Fusionsproteine.
2. Die HSF-Fusionsproteine binden konstitutiv an HSE-Sequenzen.
3. Die Hitzeschockproteine werden konstitutiv exprimiert. 10

Es wurde gezeigt, daß bei Normaltemperatur (20—25°C), d. h. unter streßfreien Bedingungen, die HSF-Fusionsproteine aktiv sind, der natürlich vorkommende HSF jedoch inaktiv ist. Erst nach einem HS kann auch die Aktivität des natürlich vorkommenden ATHSF1 beobachtet werden. 15

Übertragbarkeit der HSF-Aktivierung aus Arabidopsis auf andere Pflanzen

Die oben beschriebenen HSF-GUS- bzw. GUS-HSF-Genkonstrukte erlauben die heterologe Expression in anderen Pflanzen als Arabidopsis. Dabei führen die Fusionsprodukte aus Arabidopsis zur konstitutiven Expression von HSPs in heterologen Pflanzen. 20

Weiterhin lassen sich in anderen Pflanzen als Arabidopsis die entsprechenden HSFs in analoger Weise zu der oben ausgiebig ausgeführten Aktivierung in Arabidopsis ebenfalls aktivieren, so daß es zu einer konstitutiven Expression der HSPs durch die homologen konstitutiv aktiven HSFs kommt. 25

30

35

40

45

50

55

60

65

Tabelle 1

Biochemische und funktionelle Eigenschaften von HS-Proteinen

HSP-Familie ^a	Eigenschaften
HSP100	HSP104 ist wichtig für die Thermotoleranz in Hefe
HSP90 ^b	assoziiert in dem Cytoplasma mit regulatorischen Proteinen (inaktive Formen) in tierischen Zellen (Hormonrezeptoren, Protein-kinasen usw.)
HSP70 ^b	das am stärksten konservierte HSP, ATPase, reversible Wechselwirkung mit dem Nukleolus, die Dissoziation von anderen (denaturierten) Proteinen verlangt ATP, möglicherweise ein negativer Regulator der HS-Antwort, kann möglicherweise mit HSF wechselwirken
HSP60 ^b	molekulares "Chaperon" für die richtige Anordnung von multimeren Proteinkomplexen in Mitochondrien, Chloroplasten, möglicherweise Cytoplasma
HSP20 ^c	HS-abhängige Aggregation dieser HSP in dem Cytoplasma, Bildung von granulären Körperchen in Pflanzen, Funktion als Chaperon entsprechend dem Säuger-HSP26 <u>in vitro</u>
Ubiquitin	8 kDa Protein, das an der Erkennung von Proteinen für den proteolytischen Abbau beteiligt ist
HSF ^b	HS-Faktor, positiver Regulator der Transkription von HS-Genen

a) Klassifiziert anhand des Molekulargewicht in kDa; es existieren verschiedene Größen in verschiedenen Organismen, aber die Struktur und Funktion ist innerhalb der Familien konserviert

b) Multiple Isoformen; häufig hitzeinduzierbare Proteine

c) Multiple HSPs; HSP-Familien in Pflanzen (die Mitglieder werden in die Chloroplasten oder ans ER transportiert); es kommt im Menschen nur ein HSP vor

Patentansprüche

1. Pflanze mit erhöhter Streßtoleranz, enthaltend mindestens einen konstitutiv exprimierten und aktiven Transkriptionsaktivator für die konstitutive Expression von mindestens einem Schutzprotein, das üblicher-

weise nur durch Streßfaktoren induziert wird.

2. Pflanze nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß der Transkriptionsaktivator ein Hitzeschockfaktor (HSF) ist.

3. Pflanze nach Anspruch 2, dadurch gekennzeichnet, daß der Transkriptionsaktivator ein Fusionsprotein aus einem HSF und einem weiteren Protein ist. 5

4. Pflanze nach einem der Ansprüche 1 bis 3, dadurch gekennzeichnet, daß die Pflanze ausgewählt wird aus der Familie der Brassicaceae, der Klasse der Magnoliatae und der Klasse der Liliatae.

5. Pflanze nach Anspruch 4, dadurch gekennzeichnet, daß die Pflanze ausgewählt wird aus den Gattungen Brassica, Beta, Solanum, Lycopersicum, Helianthus, Glycine, Zea, Hordeum, Triticum, Secale und Oryza.

6. Pflanze nach einem der Ansprüche 1 bis 5, dadurch gekennzeichnet, daß die Pflanze erhöhte Streßtoleranz zeigt gegenüber den Streßfaktoren Pathogenbefall, Verwundung, Hitze, Kälte, UV-Strahlung, hohe Lichtintensität, hohe Konzentration an Schwermetall, Salz und/oder Ozon, Azidität, Trockenheit und/oder O₂-Mangel. 10

7. Pflanze nach einem der Ansprüche 1 bis 6, dadurch gekennzeichnet, daß die Pflanze auch unter streßfreien Bedingungen einen erhöhten Spiegel an mindestens einem Schutzprotein aufweist. 15

8. Pflanze nach Anspruch 7, dadurch gekennzeichnet, daß der Spiegel an mehreren Schutzproteinen erhöht ist.

9. Nukleinsäure, die für einen in einer Pflanze konstitutiv aktiven Transkriptionsaktivator kodiert.

10. Nukleinsäure nach Anspruch 9, dadurch gekennzeichnet, daß die Nukleinsäure eine DNA ist.

11. Nukleinsäure nach einem der Ansprüche 9 oder 10, dadurch gekennzeichnet, daß der kodierte Transkriptionsaktivator ein HSF ist. 20

12. Nukleinsäure nach einem der Ansprüche 9 bis 11, dadurch gekennzeichnet, daß der kodierte Transkriptionsaktivator ein Fusionsprotein aus einem HSF und einem weiteren Protein ist.

13. Nukleinsäure nach einem der Ansprüche 9 bis 12, dadurch gekennzeichnet, daß sie weiterhin ein oder mehrere regulatorische Elemente umfaßt für die Expression der kodierenden Sequenz in einer Pflanze. 25

14. Pflanzenzelle, enthaltend eine Nukleinsäure nach einem der Ansprüche 9 bis 13.

15. Pflanze, die aus einer Pflanzenzelle nach Anspruch 14 erhältlich ist.

16. Verfahren zum Herstellen einer Pflanze mit erhöhter Streßtoleranz, umfassend die Schritte:

a) Einbringen einer Nukleinsäure, die für einen konstitutiv aktiven Transkriptionsaktivator kodiert, in eine Pflanzenzelle, und 30

b) Regenerieren einer transgenen Pflanze aus der in Schritt a) erzeugten Pflanzenzelle.

17. Verfahren nach Anspruch 16, dadurch gekennzeichnet, daß die Nukleinsäure eine DNA ist.

18. Verfahren nach Anspruch 16, dadurch gekennzeichnet, daß die Nukleinsäure eine RNA ist.

19. Verfahren nach einem der Ansprüche 16 bis 18, dadurch gekennzeichnet, daß der Transkriptionsaktivator ein HSF ist. 35

20. Verfahren nach einem der Ansprüche 16 bis 19, dadurch gekennzeichnet, daß der Transkriptionsaktivator ein Fusionsprotein aus einem HSF und einem weiteren Protein ist.

21. Verfahren nach Anspruch 20, dadurch gekennzeichnet, daß das weitere Protein gleichzeitig als Selektionsmarker dient. 40

Hierzu 3 Seite(n) Zeichnungen

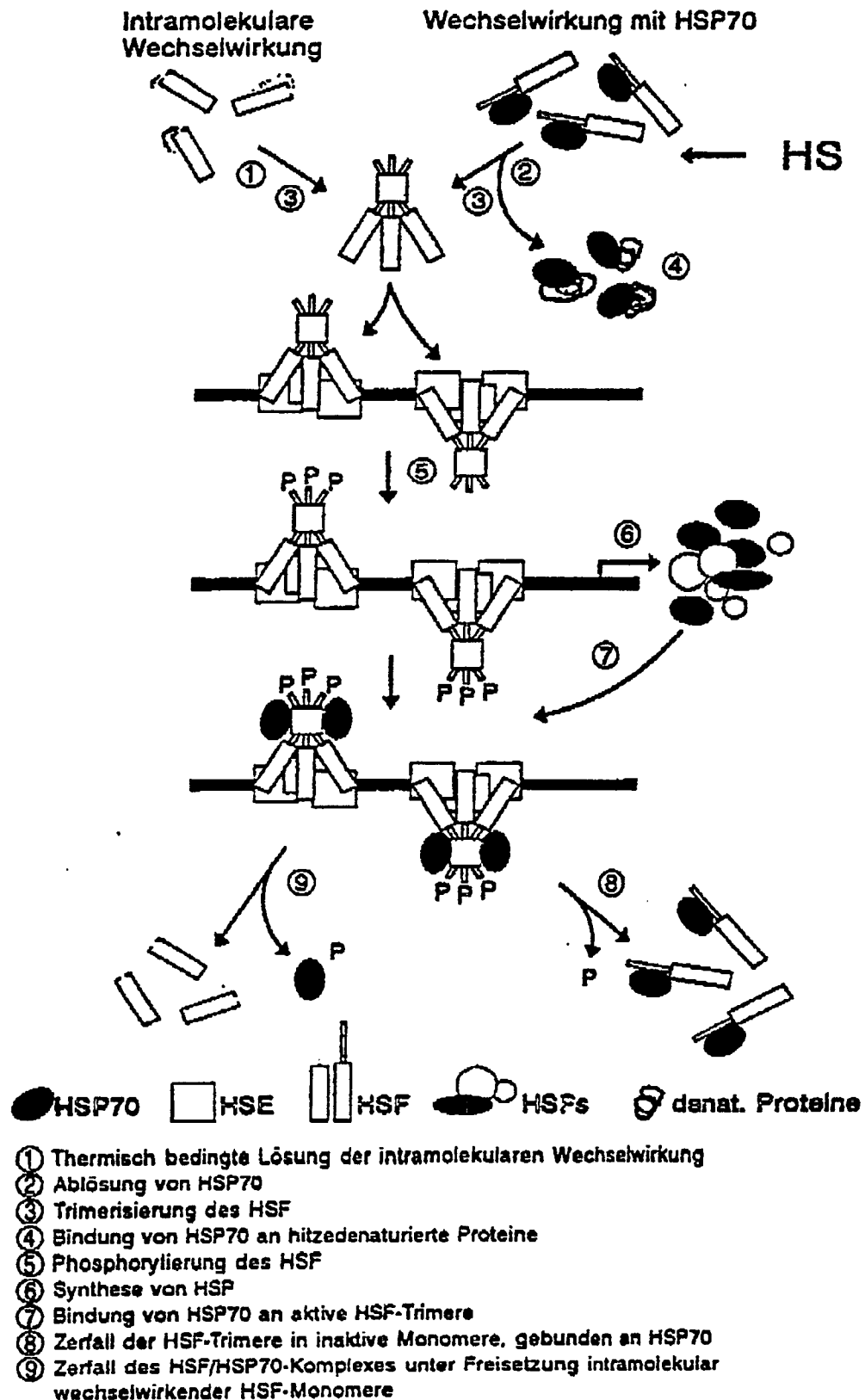
45

50

55

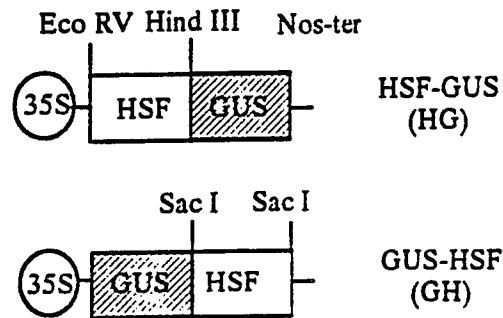
60

65



Figur 1

A



B

constructs	GUS-activity	
HSF-GUS (HG)	32.2 ± 4.6	(F0)
HSF-GUS (HG)	27.6 ± 5.3	(F1)
GUS-HSF (GH)	30.3 ± 3.7	(F0)
GUS-HSF (GH)	23.8 ± 4.6	(F1)

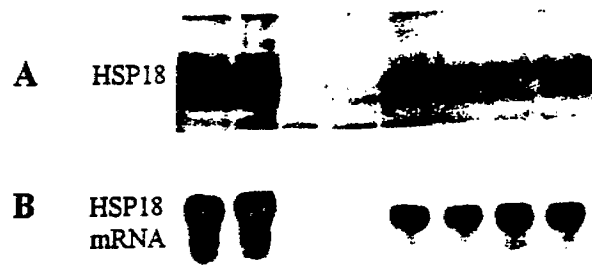
C

WT	+	+	-	-	-	-
constr.	-	-	HG	HG	GH	GH
HS	-	+	-	+	-	+



Figur 2

constr.	HG1	WT	WT	WT	HG1	HG2	GH1	GH2
HS	+	+	-	-	-	-	-	-



Figur 3